



(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(43) Date of publication:
24.07.2002 Bulletin 2002/30

(21) Application number: **01300257.1**

(22) Date of filing: **12.01.2001**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 35/78, A61K 31/575,**
A61K 9/20, A61K 9/06,
A61P 25/28, A61P 3/10,
A61P 17/00

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR
Designated Extension States:
AL LT LV MK RO SI

(71) Applicant: **Council of Scientific and**
Industrial Research
New Delhi 110 001 (IN)

(72) Inventors:
• **Pratap, Ram**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
• **Pal, Raghwendra**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
• **Singh, Satyawar**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
• **Shankar, Girja**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
• **Nath, Chandeshwar**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
• **Singh, Hemant Kumar**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)

- **Raina, Deepak**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
- **Srivastava, Arwind Kumar**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
- **Rastogi, Anil Kumar**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
- **Murthy, Puvvada Sri Ramchandra**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
- **Srivastava, Sudhir**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
- **Asthana, Onkar Prasad**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
- **Singh, Narendra**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)
- **Nand, Nitya**
Lucknow 226001 (U.P.) (IN)

(74) Representative:
Cornish, Kristina Victoria Joy et al
Kilburn & Strode,
20 Red Lion Street
London WC1R 4PJ (GB)

(54) **Gugulipid for treating cognitive disorders, hyperglycaemia and skin disorders**

(57) The present invention provides new uses of *Gugulipid*, an ethyl acetate extract of the resin of the plant *Comiphora wightii*, for controlling or preventing cognitive dysfunction, hyperglycemia and some infective conditions of the skin and a method of preparing

Gugulipid by agitating the resin in shake flask assembly or sonicating assembly and preparing a solid or a creamy dosage forms.

Description**Field of Invention**

- 5 [0001] The present invention claims some new uses of *Gugulipid*, an ethyl acetate extract of the resin of the plant *Comiphora wightii*, commonly called gum guggulu. These include modifications of the extraction methods and methods for controlling or preventing cognitive dysfunction, hyperglycemia and some infective conditions of the skin.

Background of the Invention:

10

- [0002] Ayurveda takes a holistic view of human disease. It views any disease as a dysfunction of the whole body rather than of a single organ or physiological process. Most of the Ayurvedic drugs therefore are likely to act on a number of dysfunctions of the body involving a number of organs and functions. *Gugulipid*, an ethylacetate soluble fraction of gum guggul, was developed as a hypolipidemic agent, based on the reference to the lipid lowering effect of guggul resin in Charak Samhita, a classic text of Ayurveda. Chemopharmacological investigation of this extract resulted in the characterization of guggulsterone [*cis*- and *trans*-4, 17 (20)-pregnadiene-3, 16-dione] as the major constituent. Apart from guggulsterone, other chemical constituents in the ethyl acetate soluble fraction added to and modulated the total activity. This fraction rather than pure guggulsterone was developed as a hypolipidemic drug and named *gugulipid*. As a follow up of the holistic view of Ayurveda of human disease, *gugulipid* was tested for other related and unrelated conditions / dysfunction and found to possess cognitive and anti-hyperglycemic activities and also improved in general dermal dysfunctions. These novel uses of *gugulipid* are now claimed.

Prior art

- 25 [0003] *Guggul*, highly valued in Indian system of medicine Ayurveda, is the gum resin exudate of a small tree *Comiphora wightii* belonging to the family *Burseraceae*. It is specially recommended for the treatment of obesity, lipid disorders and rheumatoid arthritis (Ayurvedic treatise: Sushruta, Vagabhatta). In Tibetan medicine, the plant (*C. Wightii*) mixed with other herbs is used for skin diseases, anemia, edema, salivation and heaviness of stomach [Lama, S. and Santra, S.C., *Sci. Cult.* 45, 262 (1979)]. Modern pharmacological studies on the crude drug and some of its fractions have supported the claims of Ayurveda. The anti-arthritis and anti-inflammatory activities were confirmed by Gujral and co-workers [Gujral, M. L., Sareen, K., Tangri, K. K., Amma, M. K. P. and Roy, A. K. *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* 4, 267 (1960)]. The hypolipidemic and anti-atherosclerotic activities reported by Dwarakanath and Satyawati. [Dwarakanath, C., and Satyawati, G. V. *Ayurveda Pradeepika* (Ceylon), 1, 69 (1970)]; Satyawati, G.V. in "Effect of an indigenous drug and disorders of lipid metabolism with special reference to atherosclerosis and obesity (Medoroga)", M.D. Thesis (Doctor of Ayurvedic Medicine), Banaras Hindu University, Varanasi, (1966)]. Later on, its ethyl- acetate extract was developed by joint efforts of Multi-Chem Research Center, Baroda and Central Drug Research Institute, Lucknow as hypolipidemic drug [A process for obtaining hypolipidemic and anti-platelet aggregation fraction from guggul resin. *Indian Patent* No.148265 dated 6.4.79., N. K. Kapoor., Sukh Dev and S. Nityanand] . A mixed type of mechanism has been implicated for lipid lowering effect of *gugulipid*. The stimulation of plasma LCAT, hepatic lipases, receptor mediated catabolism of LDL and increased faecal bile acid excretion as well as suppression of hepatic cholesterol biosynthesis are the mechanisms responsible for lipid lowering effect of *gugulipid* [S. Nityanand and N.K.Kapoor, *Ind. J. Exp. Biol.* 11, 395 (1973); N. K. Kapoor and S. Nityanand, *Ind. J. Heart Res. Supp-1* 22 (1988)]. With the discovery of hypolipidemic activity of the gum resin, systematic chemical investigations were carried out to characterize compounds of the gum resin responsible for hypolipidemic activity. Mc Cook *et al.* have recently claimed alcoholic extract of gum guggul for controlling or preventing sebum secretion from sebocytes which is associated with a shiny, undesirable appearance and a disagreeable tactile sensation [J.P. Mc Cook *et. al. U.S. Patent* 5,690,948 (1997). Antisebum and antioxidant compositions containing *gugulipid* and alcoholic fractions thereof].
- The applicants have earlier obtained a US Patent No. 6086889 for a process for isolation of lipid fraction containing Z and E guggulsterones from the aerial parts of the plant *Comiphora wightii*. The said process comprises the steps of soaking or soxhlet extracting the powdered aerial part of the plant with a non polar solvent; filtering or decanting the extract; soaking the material again in polar solvent; filtering and concentrating the extracted material in the polar solvent under reduced pressure and gel filtration or silica gel chromatography to obtain Z and E ketosteroid containing lipid fraction. The present invention introduces non-obvious modifications to the extraction method as described in the earlier prior art and describes new uses of the *Gugulipid*, which were not known earlier.

55

Genesis of the Invention

- [0004] With the isolation of variety of compounds of varied structural classes such as lignans, lipids, diterpenoids

and steroids, we initiated quite early a program to investigate structure based biological profiles of *gugulipid*. Earlier, it was revealed that the hypolipidemic and thyroid stimulating actions of guggulsterone [Tripathi, S. N., Gupta, M. Dwivedi, L. D. and Sen, S. P., *J. Res. Ind. Med.* 10, 11 (1975); Singh, V. and Kapoor, N. K. in "Stimulation of low density lipoprotein receptors activity in liver membrane of guggulsterone treated rats." In Proceedings of Society of Biological Chemists, India, 57th Annual Meeting, CSIR Center for Biochemicals, New Delhi, October 9-12, 1988].

Role In Improving cognitive functions

[0005] Recent developments in understanding of neurosteroids, role of free radicals and antioxidants in brain function as well as in hyperglycemia prompted us to explore *gugulipid* for these activities. Behavioral studies have suggested a potential role of pregnenolone, in particular, for memory enhancement. Intracerebroventricular (i.c.v.) administration of pregnenolone and pregnenolone sulfate leads to an amelioration in various memory task in rodents [Flood, J. F., Morley, J. F., and Robert, E., Memory enhancing effects in male mice of pregnenolone and of steroids metabolically derived from it; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89, 1567 (1992)]. These memory-enhancing effects might be attributed to the N-methyl-D-aspartate (NMDA)-antagonistic properties of pregnenolone sulfate since NMDA agonists have been shown to impair cognitive functions in rodents [Bowley, M. R., Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.*, 43, 813 (1993)]. As already stated, cholesterol is the precursor of neurosteroid pregnenolone. These findings prompted us to explore memory enhancing properties of *gugulipid* because of similarity among biogenic precursor of pregnenolone (1) and steroids present in *Gugulipid* such as guggulsterol-I (2), guggulsterol-II (3) and guggulsterol-III (4) (Fig-1) [V. D. Patil, U.R.Nayak and Sukh Dev: Chemistry of Ayurvedic Crude Drugs -I, *Tetrahedron* 28, 2341 (1972)].

Role In Improvement of diabetic condition

[0006] Recent years have seen increasing interest in the role of free radical oxidative damage in human disease. Free radicals are highly reactive species that have the potential to oxidize biological molecules including proteins, lipids and DNA. To prevent or retard oxidation, rich arrays of natural antioxidant mechanism exist. These antioxidant defense mechanisms have been found defective in many diseases. Increased production of free radicals has been strongly implicated in the pathophysiology of diabetes and atherosclerosis. Glucose combines with serum proteins and lipoproteins in a non-enzymatic glycation reaction and may auto-oxidize *in situ* generating free radicals and causing local oxidative damage [Hunt, J. V., Wolff, S. P. in "Oxidative glycation and free radical production; a causal mechanism of diabetic complications". *Free Radical. Res. Commun.* 12-13,115 (1991)]. The free radical scavenging antioxidants react preferentially with free radicals before vital structure can be attacked.

[0007] Troglitazone, a hypoglycemic agent has been shown to exhibit strong antioxidant activity. Its 1,4-bis-oxygenated phenyl pattern of chroman skeleton is real pharmacophore responsible for antioxidant property. *Gugulipid* and guggulsterone are also known to have antioxidant property [Guggulsterone, a potent hypolipidemic, prevents oxidation of low density lipoproteins, K.Singh, R. Chander and N.K. Kapoor, *Phytotherapy Research*, 11, 291 (1997)]. There are several molecules in lignan class where 1,2 -or 1,4-bis-oxygenated phenyl pharmacophoric pattern are present (Fig. 2). [Sukh Dev, *Proc. Ind. Sci. Acad.* 49A, 359 (1983)].

[0008] Thus the presence of above biologically potential class of molecules makes *gugulipid* a good candidate for exploration against diseases associated with dyslipidemia, hyperglycemia and behavior.

Objects of the present invention

[0009] An object of the present invention was to develop a method of extraction of Guggul resin by continuous shaking or sonication procedure to obtain improved yields of the extract. Another object of the present invention was to develop cognition enhancing effect of *gugulipid* orally in any pharmaceutical preparations.

[0010] Still another object of the present invention was to develop a method of reducing, preventing or controlling hyperglycemic conditions by consuming *gugulipid* in any pharmaceutically acceptable formulations.

Another object of the invention is to develop a method of improving conditions of infected skin.

Summary of the invention

[0011] The present provides process for extraction *gugulipid* of resin from aerial branches of the plant *C.wightii* comprises suspending gum/resin with a non-polar solvent, filtration or decantation, repetition of the process for extraction of fatty acids, extraction of residual matter with ethyl acetate by continuous shaking or sonication procedure, mixing of polar and nonpolar fractions and filtration to remove solid suspension and finally the solvent is removed to get *gugulipid*.

The invention also provides method for the preparation of pharmaceutically acceptable compositions for controlling hyperglycemic conditions and improving conditions of infected skin.

[0012] The present invention provides use of *gugulipid* (an ethyl acetate extract of gum or resin from the tree *Comiphora wighittii*) in the manufacture of an agent for reducing, controlling or preventing cognitive dysfunction, hyperglycemia or an infective condition of the skin in a mammal.

[0013] The *gugulipid* may be in any form, in particular, in the form of an extract, solid dosage or cream formulation. The use of *gugulipids* enables cognitive behaviour to be enhanced by preferably administering *gugulipid* as an extract or by mixing with other pharmaceutically acceptable additives before administration.

[0014] The use of the *gugulipid* is for the manufacture of an agent. The agent may include any further additive, suitable additives being one or more selected from a protein, carbohydrate, sugar, talc, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, starch, calcium carbonate and/or any other pharmaceutically acceptable carrier.

[0015] In the manufacture of the agent, a solid dosage may be obtained by maceration of the *gugulipid* compound with starch and microcrystalline cellulose together in a mixture, to obtain a flowable powder. The solid dosage may be obtained in the form of a tablet by dissolving *gugulipid* in ethanol and adding starch and microcrystalline cellulose. This is followed by evaporating the solvent, passing the material through 40 mesh size sieve to obtain granules and compressing the granules to obtain a tablet.

[0016] The use of *gugulipid* as per the invention may be for treating a patient suffering from a human memory dysfunction, such as Alzheimer's disease or Korsakoff's disease, optionally in combination with other treatments. The use may be for the reversal of Atropine inducing amnesia.

[0017] The use may be such that the *gugulipid*, in any form, is administered at a dosage level equivalent to 40mg/kg/day, optionally for 7 days.

[0018] The use as per the invention may be such that the hyperglycemia is a hyperglycemic condition.

[0019] The use may be wherein the *gugulipid* is as a hypoglycemic agent and results in from 30-60% decrease in the blood glucose profile.

[0020] Use may be such that the *guglipid* is administered at a dosage level of 100mg/kg of bodyweight per day.

[0021] The use may be such that the *gugulipid* decreases the blood glucose profile between from 1-7 hours following the first hour post-administration.

[0022] Use may be such that the *gugulipid* has a hypoglycemic effect at 100mg/kg of bodyweight dose, per day, and an average lowering of about 45% in blood glucose profile between 3 and 7 hours post-administration.

[0023] The use may be such that the *gugulipid* has a hypoglycemic effect at 100mg/kg of bodyweight dose in glucose loaded rats and the peak lowering effect is between 30-60 minutes post-glucose load.

[0024] The use may be such that the infected condition of the skin is a fungal infection. The agent is suitable for multiple application.

[0025] The use may be such wherein the infective condition of the skin is chronic dermatitis, ringworm or itching. The itching may be due to lesions as a result of infestation of fungi such as *Candida albicans*, *Taenia cruris* or *Taenia pedis*. The use may also be in respect of allergic conditions of the skin or anti-inflammatory activity associated with these infective conditions.

[0026] The use of *gugulipid* may be wherein the *gugulipid* is supplied as a cream of *gugulipid* 5% in polyethylene glycol (PEG). The cream is suitable for multiple applications, such as twice daily.

[0027] The present invention also provides a method for obtaining *gugulipid*, an ethylene acetate extract of gum or resin of the plant *Comiphora wighittii* and its formulations comprising:

- a) suspending gum or resin of the plant in a non-polar solvent,
- b) filtering or decanting the soluble portion
- c) optionally repeating the above steps for the extraction of fatty matter
- d) extraction of residual matter with ethyl acetate by agitation in a shake flask or by sonication
- e) mixing the extracts from the above steps a), c) and d) and filtering to remove any solid suspension, to obtain the *gugulipid*. If desired,
- f) the *gugulipid* can be converted into a solid, or creamy dosage form, for example by known methods.

[0028] In the method according to the invention, the non-polar solvent is not limited and may be selected from cyclohexane, n-hexane or another solvent. In accordance with the method of the invention, the sonicating may be performed for 30 minutes at 5000 Hz.

[0029] In the method according to the invention, the solid dosage form may be obtained by maceration of the *gugulipid* component, together with starch and microcrystalline cellulose, in suitable proportions to obtain a flowable powder.

[0030] In accordance with the method of the invention, the cream formulation may be obtained by dissolving *gugulipid* alone, or with a solvent, in suitable proportions of polyethylene glycol by heating, optionally in a water bath and then removing the solvent.

[0031] The present invention also provides a solid dosage form of *gugulipid* as well as a cream formulation of *gugulipid*.

Detailed description of the invention:

[0032] Accordingly, the present invention provides process for extraction *gugulipid* of resin from aerial branches of the plant *C.wighitii*, said process comprising

- a) suspending gum/resin of plant *C. wighitii* in a non-polar solvent for a period of 5 to 8 hours,
- b) filtration or decantation of the soluble portion,
- c) repeating the above steps for the extraction of fatty matter,
- d) extraction of residual matter with ethyl acetate by agitation on shake flask or sonicating assembly.
- e) mixing the extracts from steps (a), (c) and (d) and filtering to remove solid suspension, to obtain *gugulipid*, and if desired,
- f) converting the *gugulipid* into solid or creamy dosage forms by any known method.

[0033] The term *Gugulipid* as used herein means an ethyl acetate extract of gum /resin Guggul from the tree *C.wighiti*. The term "Ethyl acetate extract" means the non-aqueous fraction of gum/resin.

In an embodiment, the non-polar solvent is selected from n-hexane, cyclohexane or any other solvents.

In another embodiment of the invention, the yield of *Gugulipid* from the said process is in between 45- 60 %

In another embodiment of the invention, the solid dosage form is obtained by maceration of the component *gugulipid*, starch and microcrystalline cellulose in suitable proportions in a mixer till the mixture becomes flowable powder.

In another embodiment of the invention, the cream formulations is obtained by dissolving *gugulipid* alone or with help of solvent in suitable portions of polyethylene glycol by heating on water-bath and pulling off the solvent.

[0034] In another embodiment of the invention, *gugulipid* in combination with or associated with an additive is used for controlling or preventing cognitive dysfunction, hyperglycemia and some infective conditions of the skin in mammals. In another embodiment of the invention, *Gugulipid* is administered in the form of extracts, solid dosages or cream formulations as may be suitable.

In another embodiment of the invention, for enhancing cognitional behavior by feeding *gugulipid* or mixed with other agent of similar property given orally in the form of suitable pharmaceutical preparations and with amount necessary for activity.

In another embodiment of the invention, for reversal of Atropine induced amnesia in male swiss mice by administrating *gugulipid* dosage equivalent to 40 mg/kg/day for about 7 days either in the form of extracts or solid dosage.

In another embodiment of the invention, *Gugulipid* is used for treatment of patients suffering from human memory dysfunctions like Alzheimers disease and Korsakoff's disease alone or in combination with other treatments.

In another embodiment of the invention, *gugulipid* in combination with or associated with an additive is used for reducing, preventing or controlling hyperglycemic conditions by consuming necessary amount of *gugulipid* for activity in any pharmaceutically acceptable formulations.

In yet another embodiment *gugulipid* as a hypoglycemic agent decrease the blood glucose level by 30 -60% of streptozotocin induced diabetic rats at 100mg/kg body weight between 1-7 hrs and evident from first hour post administration of *gugulipid* either in extract or solid dosage form.

In yet another embodiment *Gugulipid* has hypoglycemic effect at 100mg/kg of body weight per dose and the average lowering of about 45% in blood glucose profile between 3-7 hrs.

[0035] In yet another embodiment, *Gugulipid* has hypoglycemic effect at 100mg/kg of body weight dose in glucose-loaded rats and the peak lowering effect is between 30-60 min. post glucose- load.

[0036] The inventive methods of controlling memory dysfunction, hyperglycemic or infectious conditions of skin conditions employ *gugulipid* or extract of gum/resin in pharmaceutically acceptable dosage forms.

Brief Description of Accompanying Drawings:

[0037]

Figure. 1 shows the structure of Cholesterol metabolite and related compounds in *gugulipid*.

Figure. 2 shows the structure of Lignans from *Commiphora mukul* and Troglitazone with 1,2- or 1,4-bis-oxygenated phenyl pharmacophore.

Figure. 3 shows the effect of *Gugulipid* and *Ginkobyloba* on Atropine induced dementia in passive avoidance test.

[0038] The following examples are given by the way of illustration and should not be construed to limit the scope of

the present invention.

Example-I

- 5 [0039] This example discloses the method of obtaining *gugulipid* in higher yields and preparation of its dosages formulations.

Improved extraction procedure of *Gugulipid* from resin:

- 10 [0040] In earlier extractive procedure, the occasional hand shaking of gum/resin produced *gugulipid* in 30-40% yields. When above hand shaking procedure is changed to shaking the content in continuous shake flask assembly driven by electric motor or to agitation with sonicator, it improved the yields of *gugulipid* appreciably.
- [0041] In a typical procedure: gum/resin (200g) is suspended in n-hexane (~200ml) in shake flask assembly for 5-6 hrs. Hexane soluble portion is decanted off and procedure is repeated once again to extract fatty matters. The residual
- 15 material changes from sticky to freely movable matter which is then extracted with ethyl acetate (~3x200ml) by shaking on continuous shake-flask assembly for 10-12h. Both the hexane and ethyl acetate fractions are mixed and filtered to remove solid suspension. The solvent removed to give *gugulipid* (96 g, 45% yield). The various experiments revealed the improvement of the total yield to the extent of 45 -50%.
- [0042] The similar experiment in sonicating assembly (~30 min, 5000 Hz) also exhibits the improvement in yield of
- 20 about 45 to 65%.
- [0043] The *gugulipid* conforms to the specifications of Indian Pharmacopoeia, 1996.
- [0044] The solid dosage form may be obtained by maceration of the component *gugulipid*, starch and microcrystalline cellulose in suitable proportions in a mixer till the mixture becomes flowable powder. This can be filled in capsules or converted into tablets as per desired specifications.
- 25 [0045] In a typical example, *gugulipid* (40 g) was dissolved in ethyl alcohol (~100 ml). To this solution, starch (5.5 g) and microcrystalline cellulose (54.5 g) were added and mixed well. The solvent was evaporated below 50°C and the material was passed through 40-mesh size sieve to obtain granules. The granules were then compressed into tablets.
- [0046] The cream formulations may be obtained by dissolving *gugulipid* alone or with help of solvent in suitable portions of polyethylene glycol PEG 400, PEG 1500 and PEG 6000 by heating on water-bath and pulling off the solvent.
- 30 [0047] In a typical example, *gugulipid* (10g) was dissolved in PEG 400(52 g), to this PEG 1500 (112g) and PEG 6000 (26 g) was added, heated on water bath till all the contents melt completely. The solution was cooled with occasional stirring.
- [0048] The following specific examples further illustrate the invention, but the invention is not limited thereto.
- 35

Example II

- [0049] This example reports cognition enhancing property of *gugulipid* in animal model of Alzheimer's disease.

40 Comparative study of *Gugulipid* and *ginkgo biloba* as cognitive enhancer by passive avoidance test.

- [0050] One of the most common tests in memory research is the inhibition to imitate activities or learned habits. The term "passive avoidance" is usually employed to describe experiments in which the animal learns to avoid a noxious event by suppressing a particular behavior. Different forms of human memory dysfunctions can be modeled in the
- 45 animal by the administration of different centrally acting drugs to normal, healthy subjects. Anticholinergics like scopolamine or atropine produces transient amnesic effects similar to the deficits observed in the patients with Alzheimer's disease (AD), whereas benzodiazepines produce effects similar to the anterograde amnesia typical of patients with Korsakoff's disease (KD).

50 Rationale of test procedure:

- [0051] When a mouse or rat is put in a closed chamber consisting of interconnected dark and lighted compartments, it prefers to be in dark near walls, but when given an electric shock in the dark compartment it moves to the lighted compartment and remains there till it remembers the danger. A typical paradigm of testing cognition behavior consist
- 55 of three phases: *Familiarization*: the animal is placed in the lighted compartment and after 10 seconds of exploration, it returns to the home cage. *Learning*: Immediately after the animal has come to the dark room, an unavoidable foot shock is applied and the animals returned to the illuminated side. *Retention test*: 24 hr after the learning trial, the animal is again placed to the illuminated side after feeding test drug and the procedure of learning is repeated. The latency

period is measured. *Evaluation:* the time of latency during the learning and retention test phase is measured. A prolongation of the latency period is defined as *learning*.

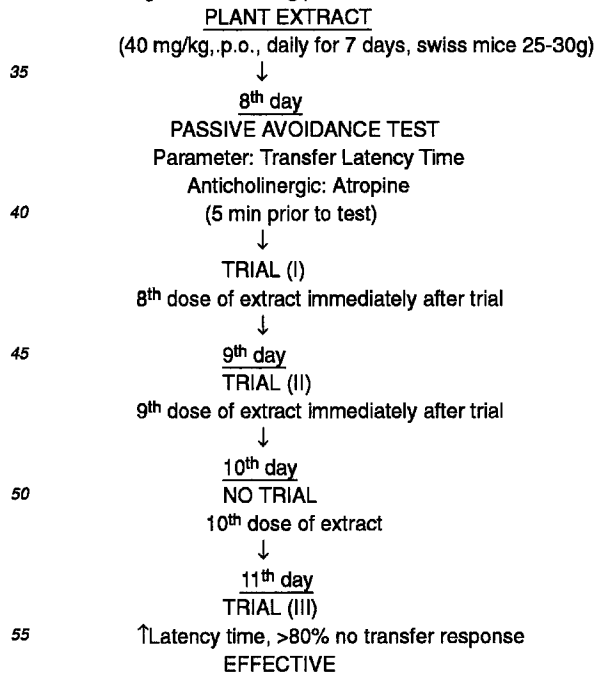
Passive avoidance test:

[0052] The mice were subjected to single trial passive avoidance test as described by Brioni *et al* [Brioni, J. D.; Hock, F. J. and McGaugh, J. J. in 'Drug Effects on Learning and Memory'. H. G. Vogel and W. H. Vogel (Eds.). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* Springer-Verlag, Berlin, 1997]. The passive avoidance test was studied by a computerized shuttle box (Columbus Instruments, Ohio, USA) provided with a software program PACS 30. The shuttle box is comprised of two compartments. An automated door was used to isolate the compartments. After an exploration period of 30 seconds for acclimatization, the animal was subjected to a trial of 270 seconds. Each mouse was placed in the bright (light intensity 10) compartment and on transfer into the dark compartment it was given an electric shock (0.5mA for 5 s) through a floor grid. The computerized door was set to close upon transfer, subjecting the mouse to the full duration of electric shock. Infrared sensors monitor the transfer from one compartment to another, which recorded as transfer latency time (TLT) in seconds. TLT was recorded in control and acute stress group (30 min after immobilization) on day 1 (trial I) and next day (trial II). In chronic stress group trial I was given 30 min after immobilization (day 5) and trial II 24 hrs later. The criterion for improved cognitive activity was taken as an increase in the TLT on trial II as compared to trial I.

Procedure

Effect of administration of *gugulipid* as Extract:

[0053] Male Swiss mice (25-30 g) were randomized into 4 groups (n = 10). Extracts *Gugulipid* (40mg/kg/day.) and *G. biloba* (30 mg/kg/day.) were administered in one group each for 7 days, in the other two groups corresponding volume vehicle was administered. On the 8th day atropine (4 mg/kg, imp.) was administered in each animal of extract treated and one vehicle group 5 min before Passive Avoidance Test in a computerized shuttle box using PACS-30 software. The transfer latency time (TLT) from illuminated chamber to the dark chamber was recorded in all the groups. Mean values and standard error (SE) of mean was calculated TLT (passive avoidance test) of each group. The significance of difference between the values of two groups was determined by Student's 't' test. *Gugulipid* is equally active to the standard drug *G. biloba* and the data is presented in bar diagram (Fig.3). The experiments were carried out according to the following protocol:



[0054] Both the extract treated groups showed significant reversal of atropine induced amnesia.

Effect of administration of solid dosage of *Gugulipid*:

[0055] *Gugulipid* solid dosage form equivalent to 40mg/kg/day for 7 days was administered in swiss mice. It was found equally effective to the standard drug Ginkobiloba in passive avoidance test model.

5 Solid dosage form was prepared by mixing *gugulipid* with starch or microcrystalline cellulose.

Example III

[0056] This example reports anti-hyperglycemic property of *gugulipid* in streptozotocin induced diabetic rats.

10

Anti-hyperglycemic activity in streptozotocin induced diabetic rats:

[0057] Charles Foster strain male albino rats of the body weight 140 ± 20 . 0g were used in this experiment. Streptozotocin was dissolved in citrate buffer and calculated amount of the fresh solution was injected in over night starved rats (50 mg/kg body weight, intraperitoneal, i.p.). Blood samples were collected 48 hrs after the streptozotocin administration. Rats having glucose levels 250 mg/dl in blood were finally selected for the experiments. They were divided in two groups of six rats each. Animals of group I received an equal amount of methylcellulose, while animals of group II received *gugulipid* (1.2% in methylcellulose) 100mg/kg body weight respectively. Blood samples were collected at 0 hour and after that at hourly intervals up to 7 hrs. Post administration of vehicle/*gugulipid* and blood glucose level was immediately estimated by glucose oxidase method. Food but not water was withheld during the experiment.

15

20

Glucose estimation:

[0058] Glucose is oxidized by glucose oxidase to gluconic acid. The dihydrogen peroxide produced in the reaction is determined by means of o-dianisidine in the presence of peroxidase yielding a colored dye. The amount of dye formed is the measure of the glucose concentration in the sample. Absorption of oxidized o-dianisidine can be measured at 436 nm.

25

30

$$\% \text{Anti-hyperglycemic activity} = \frac{\text{Average blood glucose level of test substance-treated group at test time}}{\text{Average blood glucose level of untreated group at that time}} \times 100$$

35

40

45

50

55

Table 1:

Blood glucose profile of streptozotocin induced diabetic rats post administration of <i>gugulipid</i> (single dose).								
Group	Blood glucose level (mg/dl) hours post treatment							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Control	312 ± 18.5	320 ± 17.4	310 ± 14.3	311 ± 15.9	309 ± 15.8	305 ± 15.5	305 ± 20.0	306 ± 19.5
<i>Gugulipid</i>	293 ^{Ns} ± 13.3	222* ± 27.9 (-30.6)	222* ± 27.9 (-30.9)	186** ± 35.8 (-40.19)	171** ± 29.4 (-44.66)	156** ± 36.3 (-48.85)	139*** ± 22.9 (-54.42)	107** ± 18.4 (-65.0)

Figure in parenthesis shows % lowering in blood -glucose level from control value Ns not significant; * significant (p<0.05); ** Highly significant (p<0.01); *** Very highly significant (p< 0.001).

Conclusion:

[0059] The results shown in table-1 clearly demonstrates that *Gugulipid* has hypoglycemic effect at 100 mg/kg body weight dose and the average lowering was observed 45% between 3 to 7 h. in blood glucose profile, was evident from first hour post administration of *gugulipid*.

Anti- hyperglycemic activity of *Gugulipid* when administered as Solid dosage:

[0060] Tests were carried out on Charles foster albino rats in streptozotocin induced diabetic model. *Gugulipid* in solid dosage form equivalent to 100mg/kg caused about 45% reduction in glucose level between 3 to 7 hours after dose administration.

Anti- hyperglycemic activity of *Gugulipid* in glucose loaded rats:

[0061] Charles foster male albino rats as obtained from the animal colony of the Institute were housed in plastic cages. Their blood glucose profiles were determined after starving the animals over night. Animals showing blood glucose profile between 60 to 70 mg/dl were finally selected, and divided into two groups consisting of five animals in each group. Animals of group II received *gugulipid* suspension in 1.2 % methylcellulose at a dose level of 100 mg /kg body weight orally whereas the animals of group -I received an equivalent amount of vehicle. A glucose load of 2.0 g/kg was given to each of the animal's 30 minutes post treatment. Blood was collected at 30, 60, 90, and 120 minutes post glucose load and analyzed for blood glucose. Percent inhibition of the test substance was determined according to the following formula:

$$\% \text{Anti-hyperglycemic activity} = 100 - \frac{\text{Average blood glucose level of test substance-treated group at test time}}{\text{Average blood glucose level of untreated group at that time}} \times 100$$

Table 2:

Blood glucose level profile of glucose loaded rats.					
Group	Blood glucose level (mg/dl) hours post treatment				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Control	67.75 ± 2.7	105.0 ± 1.98	92.87 ± 3.0	79.43 ± 1.48	75.57 ± 2.6
<i>Gugulipid</i> (100mg/kg)	64.85 ^{Ns} ± 2.3	73.14 ^{***} ± 2.1 (-30.34)	74.82 ^{**} ± 2.9 (-19.43)	82.23 ± 2.3	79.3 ± 3.0

Figure in parenthesis shows % lowering in blood - glucose level from control value.

Ns not significant (p> 0.05), ** Highly significant (p<0.01),

*** Very highly significant (p< 0.0)

The results shown in table 2 clearly demonstrates that *gugulipid* has hypoglycemic effect at 100mg/kg body weight dose and the peak lowering effect was observed between 30 to 60 minutes post -glucose load.

Conclusion

[0062] *Gugulipid* has marked hypoglycemic effect at 100 mg /kg body weight dose in glucose-loaded rats.

Example-IV

[0063] This example reports Antifungal property of *gugulipid* for dermal conditions.

Antifungal Property of *gugulipid*:

[0064] Considering its use in skin diseases in Ayurveda, the present study was carried out with *gugulipid* for some of the common fungal skin conditions. As there was no knowledge about the skin diseases where *gugulipid* ointment

can be useful, a search - screening clinical trial was under taken on variety of skin diseases. The ointment was prepared by dissolving gugulipid with the help of solvent in a suitable proportion of polyethylene glycol (PEG) 400, PEG-1500 and PEG-6000 by heating on water bath and pulling off the solvent. The placebo sample was prepared by mixing PEGs in above ratios. Each patient first applied the placebo -cream twice a day for a week and then shifted to *gugulipid* cream.

5 5% content of *Gugulipid* cream in PEG applied twice a day on human skin was effective in chronic dermatitis, ring worm and itching due to the lesions due to the infestation of fungi (such as *Candida albicans*, *Taenia cruris*, *Taenia pedis*), allergic conditions skin and had anti-inflammatory activity associated with these infective conditions.

[0065] It should be understood that the specific forms of the invention illustrated and described so far are intended to be representative only. The change, including but not limited to those suggested in this specification, may be made in the illustrated embodiments without departing from the clear teaching of the disclosure. Accordingly, reference should be made to the following appended claims in determining the full scope of the invention.

10

Advantages of the Present Invention:

15 [0066]

1. The extraction of Guggul resin by continuous shaking or sonification procedure as described in the present invention exhibits improvement in yields as compared to the conventional method of extraction.
2. The present invention also provides a method for preparing solid dosage and cream formulations of *Gugulipid* in addition to extracts. *Gugulipid* can therefore be provided in form of extracts, tablets or cream formulations which-
- 20 ever is more suitable for the treatment of a particular ailment.
3. The present invention provides new uses of *Gugulipid* for enhancement of cognition, reducing, controlling or preventing hyperglycemic conditions and improving infectious condition of the skin.

25 Claims

1. Use of gugulipid, an ethyl acetate extract of gum or resin from the tree *Comiphora wightii*, in the manufacture of an agent for reducing, controlling or preventing cognitive dysfunction, hyperglycemia or an infective condition of the skin in a mammal.
- 30 2. Use, as claimed in claim 1 wherein, *gugulipid* is in the form of an extract, solid dosage or cream formulation.
3. Use, as claimed in claim 1 or claim 2 wherein, cognitional behavior is enhanced by administering gugulipid as an extract or mixing with other pharmaceutically acceptable additives.
- 35 4. Use, as claimed in any one of claims 1 to 3 wherein, the agent includes an additive, the additive being one or more selected from protein, carbohydrate, sugar, talc, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, starch, calcium carbonate and/or a pharmaceutically acceptable carrier.
- 40 5. Use, as claimed in any one of claims 1 to 4 wherein, the solid dosage is obtained by maceration of the compound gugulipid, starch and microcrystalline cellulose in a mixture, to obtain a flowable powder.
- 45 6. Use, as claimed in any one of claims 1 to 4 wherein, the solid dosage in the form of a tablet is obtained by dissolving gugulipid with ethanol and adding starch and microcrystalline cellulose, evaporating the solvent, passing the material through 40 mesh size sieve to obtain granules and compressing the granules to obtain a tablet.
7. Use, as claimed in any one of claims 1 to 6 for treating a patient suffering from a human memory dysfunction, such as Alzheimer's disease or Korsakoff's disease, optionally in combination with other treatments.
- 50 8. Use, as claimed in any one of claims 1 to 7 for the reversal of Atropine inducing amnesia.
9. Use, as claimed in any one of claims 1 to 8, wherein the gugulipid is administered at a dosage level equivalent to 40mg/kg/day, optionally for 7 days.
- 55 10. Use, as claimed in any one of claims 1 to 9 wherein the hyperglycemia is a hyperglycemic condition.
11. Use, as claimed in any one of claims 1 to 10 wherein, use of gugulipid as a hypoglycemic agent results in from 30

- 60% decrease in blood glucose profile.

12. Use, as claimed in any one of claims 1 to 11, wherein the *gugulipid* is administered at a dosage level of 100mg/kg-body weight.
13. Use, as claimed in any one of claims 1 to 12 wherein, the *gugulipid* decreases the blood glucose profile between 1-7 hrs from the first hour post administration.
14. Use, as claimed in claim 12 wherein, *gugulipid* has a hypoglycemic effect at 100mg/kg of body weight dose and an average lowering of about 45% in blood glucose profile between 3-7 hrs.
15. Use, as claimed in claim 12 wherein, *gugulipid* has a hypoglycemic effect at 100mg/kg of body weight dose in glucose loaded rats and the peak lowering effect is between 30-60 min. post glucose- load.
16. Use, as claimed in any one of claims 1 to 15, wherein the infective condition of the skin is a fungal infection, optionally the agent being applied by multiple application.
17. Use, as claimed in any one of claims 1 to 16, wherein the infective condition of the skin is chronic dermatitis, ring worm or itching due to the lesions due to the infestation of fungi such as *Candida albicans*, *Taenia cruris*, *Taenia pedis*, allergic conditions of skin or anti-inflammatory activity associated with these infective conditions.
18. Use, as claimed in claim 16 or claim 17, wherein the *gugulipid* is applied as a cream of *gugulipid* 5% in polyethylene glycol (PEG), optionally twice daily.
19. A method of obtaining *gugulipid*, an ethyl acetate extract of gum or resin of plant *C.wighitti* and its formulations comprising:
 - a) suspending gum or resin of plant *C. wighitti* in a non-polar solvent,
 - b) filtration or decantation of the soluble portion,
 - c) optionally repeating the above steps for the extraction of fatty matter,
 - d) extraction of residual matter with ethyl acetate by agitation on shake flask or sonicating assembly.
 - e) mixing the extracts from the above steps a, c and d and filtering to remove solid suspension, to obtain *gugulipid*, and if desired,
 - f) converting the *gugulipid* into solid or creamy dosage forms by any known method.
20. A method as claimed in claim 19 wherein, the non-polar solvent is selected from cyclohexane, n-hexane or any other solvents.
21. A method as claimed in claim 19 or claim 20 wherein, the sonicating is performed for 30 minutes at 5000 Hz.
22. A method as claimed in any one of claims 19 to 21 wherein, the solid dosage form is obtained by maceration of the component *gugulipid*, starch and microcrystalline cellulose in suitable proportions in a mixer to obtain a flowable powder.
23. A method as claimed in any one of claims 19 to 21 wherein, the cream formulation is obtained by dissolving *gugulipid* alone or with help of solvent in suitable portions of polyethylene glycol by heating, optionally in a water-bath and removing the solvent.
24. A solid dosage form of *gugulipid*.
25. A cream formulation of *gugulipid*.

Figure 1: Cholesterol metabolite and related compounds in gugulipid.

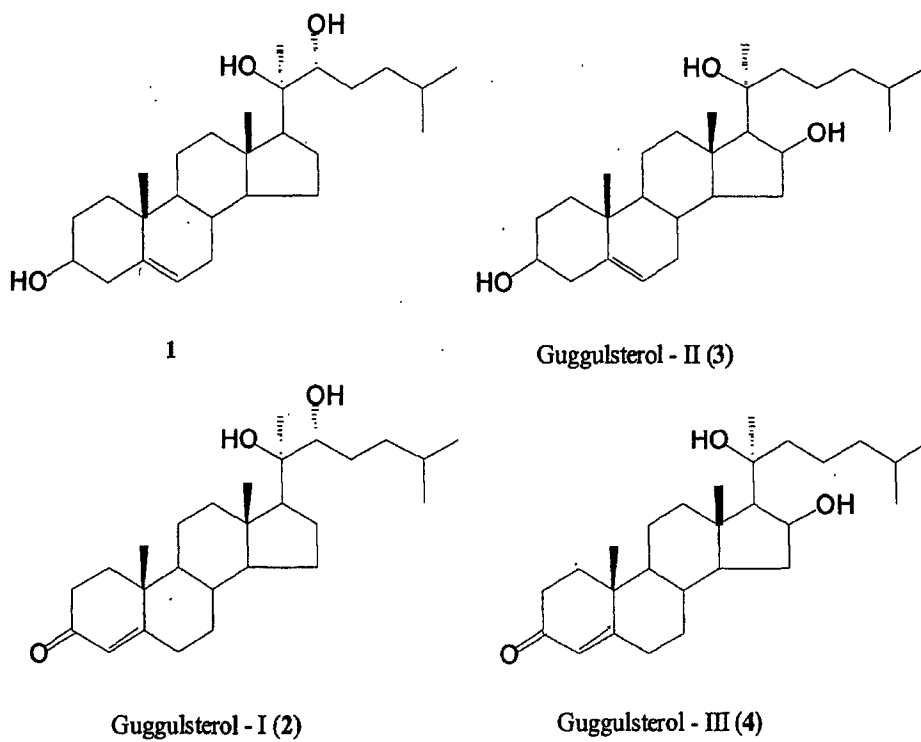
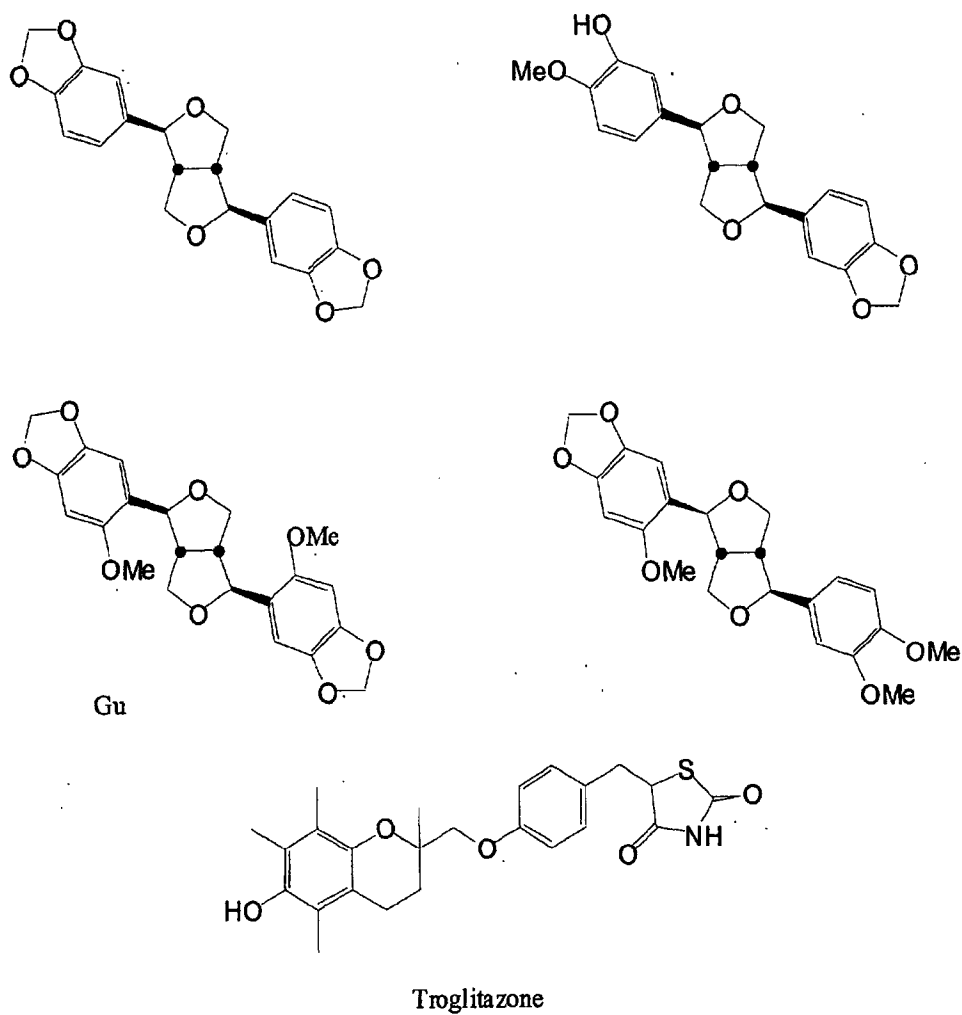
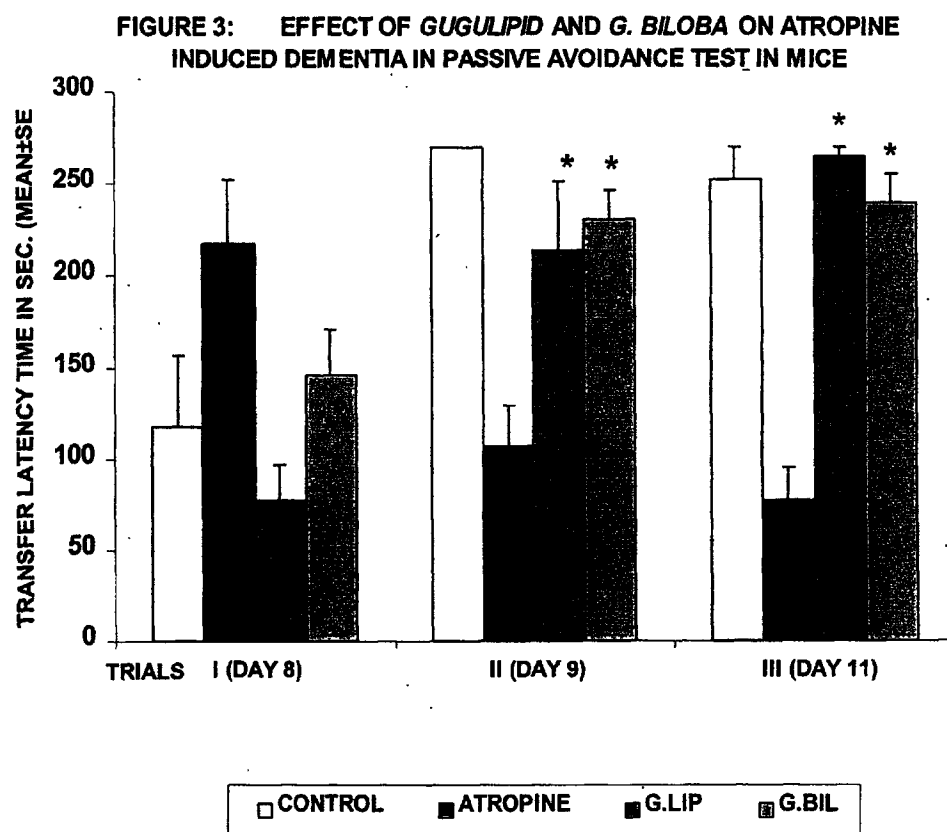


Figure2: Lignans from *Commiphora mukul* and Troglitazone with 1,2- or 1,4-bis-oxygenated phenyl pharmacophore.







European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 01 30 0257

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	GB 2 343 115 A (PROLAB NUTRITION INC) 3 May 2000 (2000-05-03) * page 17, line 16 - line 18 *	1,2,4-6, 9-15	A61K35/78 A61K31/575 A61K9/20 A61K9/06
X	THAPPA DEVINDER M ET AL: "Nodulocystic acne: Oral gugulipid versus tetracycline." JOURNAL OF DERMATOLOGY (TOKYO), vol. 21, no. 10, October 1994 (1994-10), pages 729-731, XP001007886 ISSN: 0385-2407 * abstract *	1,2,4-6, 9,12,18	A61P25/28 A61P3/10 A61P17/00
A,D	US 6 086 889 A (AGARWAL SANTOSH KUMAR ET AL) 11 July 2000 (2000-07-11) * examples 1-4 *	19-23	
X	EP 1 020 191 A (COUNCIL OF SCIENT AND) 19 July 2000 (2000-07-19) * Compound 9 in Table 2 * * page 11, line 15 - page 12, line 1; claim 1 *	1,2,4-6, 9-15	
X	SALUTGI S B ET AL: "EFFECT OF THE INDIGENOUS DRUG 'LIPIDSOL' ON CERTAIN METABOLIC PARAMETERS IN GOATS" INDIAN VETERINARY JOURNAL, MADRAS, IN, vol. 73, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 1035-1038, XP001038135 ISSN: 0019-6479 * first paragraph on page 1035 * * page 1036, column 1 lines 18 - 23 * * Summary *	1,2,4-6, 9-15	A61K A61P
X	US 5 273 747 A (BOMBARDELLI EZIO ET AL) 28 December 1993 (1993-12-28) * abstract * * column 2, line 42 - line 44 *	1,2,4-6, 9,12, 16-18	
-/-			
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 10 January 2002	Examiner Pilling, S
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

EPO FORM 1503 (02.02) (P04G01)



European Patent
Office

**LACK OF UNITY OF INVENTION
SHEET B**

Application Number
EP 01 30 0257

The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirements of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

1. Claims: 3,7,8 and Claims 1,2,4-6,9,12 in part
use of gugulipid in the manufacture of an agent for treating
COGNITIVE DYSFUNCTION
2. Claims: 10,11,13-15 and Claims 1,2,4-6,9,12 in part
use of gugulipid in the manufacture of an agent for treating
HYPERGLYCAEMIA
3. Claims: 16-18 and Claims 1,2,4-6,9,12 in part
use of gugulipid in the manufacture of an agent for treating
an INFECTIVE CONDITION OF THE SKIN
4. Claims: 19-23
a method of making an ethyl acetate gugulipid EXTRACT
5. Claim : 24
SOLID dosage forms of gugulipid
6. Claim : 25
CREAM formulations of gugulipid



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 01 30 0257

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	US 5 690 948 A (BAJOR JOHN STEVEN ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25) * abstract * * column 1, line 46 - line 53 *	1,2,4-6, 9,12,18	
X	SATYAVATI G V: "GUGGULIPID: A PROMISING HYPOLIPIDAEMIC AGENT FROM GUM GUGGUL (COMMIPHORA WIGHTII)" ECONOMIC AND MEDICINAL PLANT RESEARCH: PLANTS AND TRADITIONAL MEDICINE, vol. 5, 1991, pages 47-82, XP001039709 * II. B Uses of guggul in folklore and ethnomedicine * * IV. Chemical investigations of guggul gum *	1,2,4-6, 9,12, 16-18	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 10 January 2002	Examiner Pilling, S
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document			

EPO FORM 1508 03/02 (P04001)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 01 30 0257

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

10-01-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2343115	A	03-05-2000	US 6113949 A	05-09-2000
			EP 0997149 A1	03-05-2000
US 6086889	A	11-07-2000	NONE	
EP 1020191	A	19-07-2000	EP 1020191 A1	19-07-2000
US 5273747	A	28-12-1993	IT 1247933 B	05-01-1995
			DE 69230654 D1	16-03-2000
			DE 69230654 T2	10-08-2000
			DK 513671 T3	13-06-2000
			EP 0513671 A1	19-11-1992
			HK 1011613 A1	30-06-2000
			JP 5178755 A	20-07-1993
			KR 196759 B1	15-06-1999
US 5690948	A	25-11-1997	AU 5485798 A	03-08-1998
			BR 9714484 A	16-05-2000
			CN 1248908 A	29-03-2000
			WO 9830199 A1	16-07-1998
			EP 0951275 A1	27-10-1999
			JP 2001508055 T	19-06-2001

EPO FORM P0469

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 738 565**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **95 10710**

(51) Int Cl⁶ : C 07 C 403/08, 403/20, A 61 K 7/48

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 13.09.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 14.03.97 Bulletin 97/11.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : *PARFUMS CHRISTIAN DIOR
SOCIÉTÉ ANONYME — FR.*

(72) Inventeur(s) : ANDRE PATRICE, LHERMITE
STEPHANE et PELLICIER FRANCOISE.

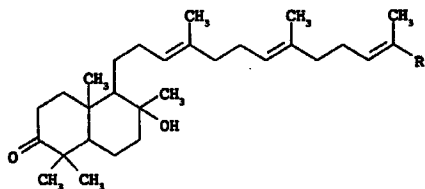
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET BEAU DE LOMENIE.

(54) **PRODUITS EXTRAITS D'UNE PLANTE DU GENRE COMMIPHORA, EN PARTICULIER DE LA PLANTE
COMMIPHORA MUKUL, ET EXTRAITS EN CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS NOTAMMENT EN
COSMÉTIQUE.**

(57) L'invention concerne des produits extraits d'une plante
du genre Commiphora, en particulier de la plante
Commiphora mukul.

Ces produits répondent à la formule I suivante:



dans laquelle R représente:

- a) un groupement CH_2OH ,
 - b) un groupement COOH ,
- ainsi que leurs sels ou esters.

Ces produits ainsi que les extraits en contenant sont des
agents cosmétiquement efficaces à la lutte contre les rides.

FR 2 738 565 - A1



L'invention concerne l'utilisation en cosmétique d'extraits d'une plante du genre Commiphora, en particulier de la plante Commiphora mukul, notamment
5 comme agent à activité anti-rides. Elle concerne également à titre de produits industriels nouveaux, deux produits particulièrement actifs isolés à partir de ces extraits ainsi que des dérivés de ces produits nouveaux.

On sait que la plante Commiphora mukul fait partie de la famille des Burséracées. Le Commiphora mukul est une plante originaire de l'Inde très utilisée
10 en médecine traditionnelle de l'Inde, en médecine Ayurvédique. En particulier dans ces applications, on utilise une résine produite par Commiphora mukul appelée également Guggul. Dans ce traitement ayurvédique, on connaissait le traitement de l'obésité et des désordres lipidiques ainsi que des maladies rhumatismales.

Il est à noter que le terme "guggul" désigne à la fois la plante et la
15 résine qu'elle produit. Par ailleurs, cette plante est un petit arbre ou un arbuste de 1,2 à 1,8 m de hauteur qui pousse essentiellement en Inde et l'incision de la plante permet de récolter la gomme-résine de manière courante.

Récemment, on a décrit dans les brevets US-A-4 847 071, US-A-4 847 069, US-A-4 946 671 et US-A-4 954 332, des compositions
20 topiques pour la protection contre les radiations UV, contenant des absorbeurs de radicaux libres et un agent anti-inflammatoire. Parmi les nombreux agents anti-inflammatoires cités se trouve le Guggal ou extrait de Guggul.

D'autre part, il est également connu par le document EP-A-513 671 des compositions contenant un extrait lipophile total de la plante Commiphora
25 mukul en particulier obtenu à partir de la résine d'écorce de Commiphora mukul comme ingrédient actif. Cet extrait a une forte proportion en Guggulstérone. Cette composition est décrite comme présentant une activité anti-inflammatoire, immuno-modulatrice ou anti-androgène pour le traitement de l'acné et de l'hypertrophie bénigne de la prostate.

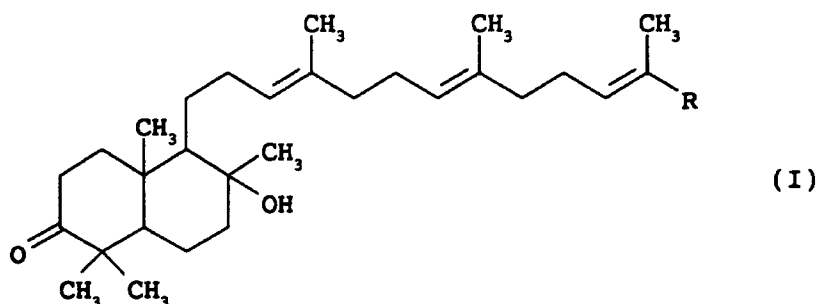
Il a été maintenant découvert de manière surprenante et inattendue que
30 les extraits de plante du genre Commiphora, en particulier de la plante Commiphora mukul, présentent une activité anti-rides et peuvent ainsi être utilisés comme agents cosmétiques destinés à améliorer l'aspect de surface de la peau, en particulier pour diminuer la profondeur des rides et faire disparaître les ridules.

A partir de cette découverte, la demanderesse a fait des études
35 systématiques complémentaires destinées à identifier des fractions particulièrement

actives responsables de cette activité. Elle a constaté, en particulier, que ces fractions contenaient deux produits nouveaux particulièrement actifs dans l'activité concernée. Ces produits ont pu être isolés et totalement identifiés à partir d'extraits de la plante *Commiphora mukul*. Ils constituent donc des produits industriels nouveaux présentant une remarquable activité comme agents cosmétiques destinés à lutter contre les rides.

L'invention concerne également des dérivés des deux produits nouveaux isolés selon l'invention.

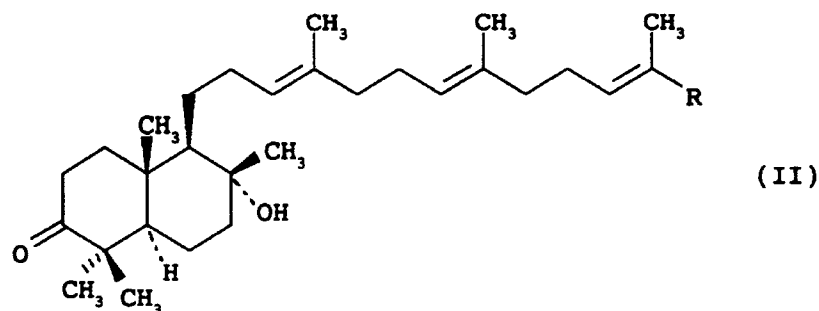
Ainsi, selon un premier aspect, l'invention concerne les produits répondant à la formule (I) :



dans laquelle R représente :

- 15 a) un groupement CH₂OH,
b) un groupement COOH,
ainsi que leurs sels ou esters.

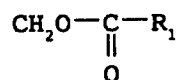
L'invention concerne tout particulièrement à titre de produits industriels nouveaux, les produits répondant à la formule (II) :



dans laquelle R représente :

- a) un groupement CH_2OH , le produit étant désigné par la formule II_a ,
- b) un groupement COOH , le produit étant désigné par la formule II_b ,
- c) un groupement

5

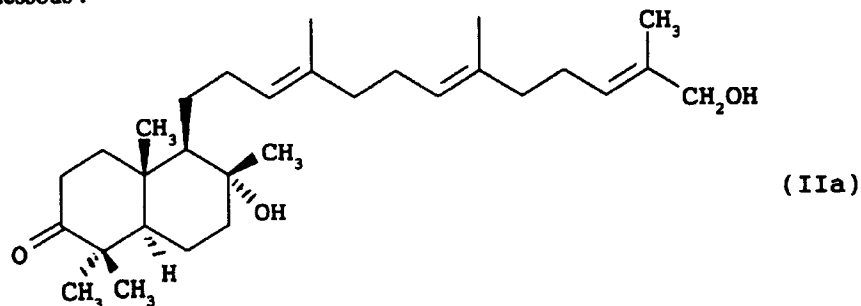


dans lequel R_1 représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, en particulier le groupe méthyle,

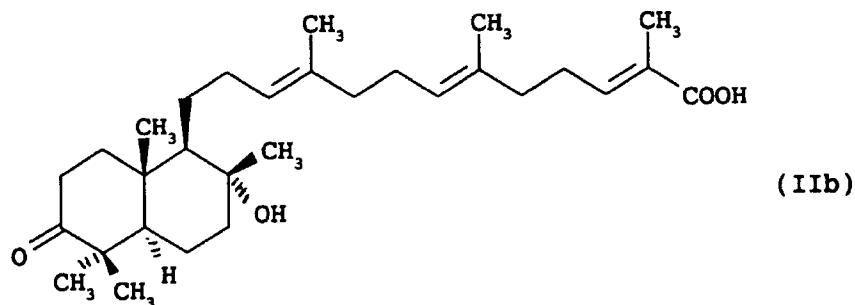
- d) un groupement COOM , où M désigne un métal alcalin, de préférence le sodium ou le potassium, ou un groupement ammonium ou amine quaternaire,
 - e) un groupement $\text{COOM}'_{0,5}$, où M' désigne un métal alcalino-terreux, de préférence le calcium,
 - f) un groupement COOR_2 , où R_2 désigne un groupement alkyle linéaire ou ramifié
- comprenant de 1 à 6 atomes de carbone.

15

L'invention concerne tout particulièrement les deux produits industriels nouveaux désignés respectivement par II_a et II_b et répondant aux formules ci-dessous :



20

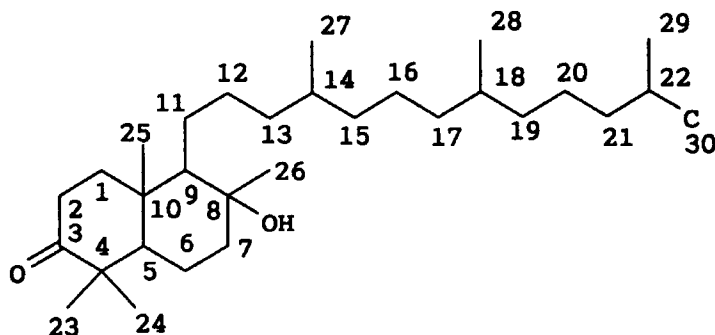


Les deux produits ont pu être isolés à partir de la plante *Commiphora mukul* et ont été complètement identifiés par différentes techniques analytiques comme cela ressort de la description qui suit.

Le produit répondant à la formule II_a , de formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$, sera désigné par "Commiphérol". Sa nomenclature est la suivante : (5R, 10S, 8R, 9R)-3-oxopolypoda-13E, 17E, 21E-triène-8,30-diol.

Le dérivé acide répondant à la formule II_b , de formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$, sera désigné par "Commiphérine". Il s'agit de l'acide (5R, 10S, 8R, 9R)-8-hydroxy-3-oxopolypoda-13E, 17E, 21E-triène-30-oïque.

La nomenclature utilisée pour désigner les produits de formules II_a et II_b ci-dessus est basée sur le nom de l'hydrocarbure correspondant qui est un triterpène : l' α -polypodatétraène, bien connu dans la littérature, par exemple dans la publication de Yoko Arai et al., *Tetrahedron Letters*, (1992) **33** (10) 1325-8, relative à la plante *Polypodiodes formosane*. La numération des atomes de carbone répond à celle indiquée ci-dessous :



Il est à noter que divers dérivés triterpéniques possédant le squelette carboné polypodane ont été identifiés dans d'autres plantes, en particulier dans des fougères du genre des Polypodiacees telles que *Polypodium vulgare*, *P. fauriei* et *P. virginianum* (Y. Arai et al., *Phytochemistry*, (1991) **30** (10) 3369-3377 ; K. Shiojima et al., *Tetrahedron Lett.*, (1983) **24** 5733), des Aspidiacees (M. Nishizawa et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1984) N°7, 467-8) et des Cheiroleuriacees (R. Kamaya et al., *Chem. Pharm. Bull.* (1990) **38** (8) 2130-2).

Selon un second aspect, l'invention concerne également des procédés de préparation des deux produits II_a et II_b à partir de la plante *Commiphora mukul* ainsi que des dérivés d'acylation du produit II_a , en particulier le produit d'acétylation et des sels et esters du produit II_b .

Différents procédés peuvent être utilisés pour isoler les produits de formules II_a et II_b à partir de la plante Commiphora mukul.

Dans ces procédés, on part avantageusement de la résine de Commiphora mukul que l'on soumet à différentes étapes d'extraction et de fractionnement successives.

On soumet ainsi de façon particulièrement avantageuse la résine de Commiphora Mukul à une première étape dite d'extraction par un solvant ou un mélange de solvants, puis on soumet ensuite l'extrait à différentes étapes de séparation destinées à isoler une fraction particulièrement active contenant au moins un des produits de l'invention.

Pour réaliser la première étape d'extraction, on peut utiliser une large gamme de solvants de polarités très différentes.

A titre d'exemples de solvants utilisables pour réaliser cette étape, on citera, par ordre de polarité croissante :

- l'éther de pétrole qui permet d'extraire 16 % en poids de la résine brute,
- le dichlorométhane qui permet d'extraire 26 % en poids de la résine brute,
- l'acétate d'éthyle qui permet d'extraire 30,5 % en poids de la résine brute,
- l'éthanol qui permet d'extraire 26,5 % en poids de la résine brute.

La figure 1 représente schématiquement différents protocoles permettant de préparer les produits de formules II_a et II_b à partir d'un extrait de la résine de Commiphora mukul selon l'invention.

Selon le schéma de la figure 1, on prépare à partir de la résine de Commiphora mukul un premier extrait selon l'invention, dénommé extrait G.

Cet extrait G est obtenu par extraction par l'éthanol à 96 % à 45°C de la résine après broyat des agrégats.

Selon une première étape, l'extrait G est ensuite soumis à une succession de fractionnements par chromatographie liquide haute performance. Chaque fraction est testée pour son activité lipogénétique sur des fibroblastes en culture, selon la méthode exposée plus loin. Ces différents fractionnements aboutissent à l'obtention d'une fraction active, FIIB, dont on repère les pics caractéristiques sur le chromatogramme.

Plus précisément, selon cette première étape, l'extrait G sera soumis dans un premier temps à un protocole B destiné à isoler les fractions les plus actives permettant de séparer par chromatographie liquide haute performance

l'extrait G en trois fractions F représentant 92,5 % de l'extrait G, FIII représentant 4,5 % de cet extrait et FIV représentant 3 %. La fraction FIII a pu être identifiée comme constituée essentiellement des stérols et la fraction FIV se compose essentiellement des produits de rinçage de la colonne chromatographique par le
5 dichlorométhane.

La fraction F est ensuite soumise au protocole C de séparation par chromatographie liquide, qui conduit à deux fractions dénommées respectivement FI et FII. On élimine la fraction F I qui est sensiblement inactive. Elle représente 21,5 % de F, et est constituée essentiellement des stérones (Z- et E-
10 guggulstérone).

La fraction FII, qui présente une activité lipogénétique, est à son tour soumise à un fractionnement par chromatographie liquide permettant de la séparer en trois fractions : FIIA représentant 19,5 % de l'extrait G, FIIB représentant 20 % de l'extrait G et FIIC représentant 31,5 % de l'extrait G. De ces trois fractions, la
15 fraction FIIB est la plus active. On repère sur le chromatogramme la position des pics correspondants.

Il est donc ensuite possible, dans une deuxième étape, d'obtenir par fractionnement selon le protocole E directement à partir de l'extrait G une fraction active, dénommée FIIB1, correspondant aux pics de la fraction FIIB.

20 Ensuite, les deux produits de formules Π_a et Π_b peuvent être séparés à partir de l'extrait FIIB1 par chromatographie liquide haute performance préparative.

Les deux produits Π_a et Π_b , dont l'activité s'est avérée sensiblement équivalente, ont été parfaitement purifiés et ont pu être isolés par chromatographie
25 liquide en utilisant les conditions suivantes :

- Colonne RP 18 Lichrospher 5 μ m 125 x 4 mm

- Mélanges : Eau + 0,1 % CF₃ COOH

Acétonitrile

30 - Détection UV : λ = 210 nm.

Le produit de formule Π_a peut ensuite être soumis à une étape classique d'acylation, en particulier d'acétylation, pour préparer les dérivés acylés correspondants, en particulier le dérivé acétylé.

Le produit II_b peut être aisément transformé en l'un de ses sels décrits ci-dessus par neutralisation de la fraction acide en bout de chaîne par une base correspondante.

5 On pourra de même aisément accéder aux produits d'estérification du produit II_b en le faisant réagir classiquement avec un alcool léger.

Ces réactions, destinées à acyler le produit II_a ou à estérifier ou salifier le produit II_b , peuvent également être réalisées directement sur un mélange contenant les deux produits actifs II_a et II_b , en particulier sur le mélange FIIB1 décrit ci-dessus.

10 Par exemple, on pourra effectuer l'acétylation de II_a par l'anhydride acétique en traitant l'extrait FIIB1 de la façon suivante : on dissout FIIB1 dans du dichlorométhane (1 volume), on ajoute 1 volume de pyridine puis 1,2 équivalent d'anhydride acétique pour 1 équivalent de FIIB1 et on laisse la réaction se faire à température ambiante durant toute une nuit.

15 La demanderesse a constaté de façon tout à fait surprenante que les extraits de la plante *Commiphora mukul*, en particulier les extraits particulièrement riches en produits répondant à la formule II_a ou II_b , présentaient une activité stimulatrice de la lipogénèse interne aux fibroblastes. Ceci se traduit par une augmentation de volume cellulaire des fibroblastes conduisant à un meilleur contact avec le réseau protéique extra-cellulaire. Le derme se trouve ainsi tonifié, ce qui permet de diminuer la profondeur des rides et des ridules, et, en conséquence, de les rendre moins apparentes. Cette activité a donc permis à la demanderesse de proposer une solution particulièrement originale pour améliorer l'aspect de surface de la peau.

25 Ainsi, selon un troisième aspect, l'invention concerne l'utilisation d'au moins un extrait de plante du genre *Commiphora*, en particulier de la plante *Commiphora mukul*, comme agent cosmétique destiné à modifier la surface de la peau, en lui conférant un aspect plus lisse par l'atténuation de la profondeur des rides et des ridules.

30 On pourra utiliser dans cette application différents extraits de la plante *Commiphora mukul*, en particulier des extraits riches en composés répondant aux formules I, II, II_a ou II_b , ou en leur mélange ou en dérivés de ces produits, tels que définis précédemment.

35 On pourra, selon une première variante, utiliser comme extrait de la plante *Commiphora mukul* la résine-gomme dite Guggul.

Selon une autre variante, on utilise comme extrait de la plante *Commiphora mukul* un extrait obtenu après broyat des agrégats de la résine, puis extraction par un solvant. Comme on l'a vu précédemment, une large gamme de solvants pourra être utilisée à cet effet.

5 Toutefois, en se référant à la classification des solvants par polarité telle que publiée en particulier par Veronika R. Meyer dans *Practical High - performance Liquid Chromatography* (1988), John Willey & Sons, p. 120-121, on choisira, de préférence, les solvants dont le paramètre de polarité p' est inférieur à 5,5 et de préférence compris entre 0,1 et 4,5.

10 L'extrait ci-dessus est avantageusement obtenu par extraction par un solvant organique ou un mélange de solvants organiques choisis dans le groupe constitué par : le n-pentane, le n-hexane, l'éther de pétrole, le cyclohexane, le n-décane, le dichlorométhane, l'isopropanol, le n-propanol, le chloroforme, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le méthanol.

15 Selon d'autres variantes de l'invention, l'extrait pourra être constitué de différents produits présentant le caractère commun d'être enrichis en au moins l'un des produits de formule I ou II, en particulier de formule II_a ou II_b, obtenus à partir de l'extrait décrit ci-dessus.

20 Comme cela est clairement illustré dans les exemples donnés en référence au schéma de la figure 1, les produits enrichis en produit(s) de l'invention peuvent être obtenus par exemple à partir de l'extrait G, en soumettant cet extrait à différentes étapes successives de séparation, notamment par Chromatographie Liquide Haute Performance ou par extraction au gaz carbonique supercritique.

25 Selon une variante particulièrement avantageuse de l'invention, on utilisera au moins l'un des produits de formule I ou II, en particulier de formule II_a ou II_b, comme agent cosmétique pour modifier la surface de la peau comme indiqué précédemment.

30 Selon un quatrième aspect, l'invention concerne également une composition, en particulier destinée à un usage cosmétique, caractérisée en ce qu'elle contient l'un au moins des produits de formule I ou II, en particulier II_a ou II_b ou des extraits de plante contenant au moins l'un de ces produits, en particulier des extraits de plante du genre *Commiphora*, encore en particulier de la plante *Commiphora mukul*, de préférence en combinaison avec un excipient ou support acceptable, en particulier cosmétiquement acceptable.

Avantageusement, cette composition contient de 0,001 à 1 % en poids de l'un au moins des produits de formule (I) ou (II), en particulier (II_a) ou (II_b), de préférence de 0,01 à 0,1 %.

5 Ou encore cette composition contient très avantageusement de 0,005 à 5 % en poids, de préférence de 0,05 à 1 % en poids d'un extrait de Commiphora mukul contenant au moins l'un des produits précités, en particulier un extrait de résine de cette plante.

Les compositions cosmétiques de l'invention peuvent être sous différentes formes, en particulier sous forme de solutions, de lait, de gel, de crème.

10 Selon une variante de l'invention, la composition cosmétique contient, en outre, une quantité cosmétiquement efficace d'un produit agissant sur la synthèse de la fibronectine et/ou sur la synthèse du collagène.

A titre d'exemple de produit agissant sur la synthèse de la fibronectine, on citera les galactolipides, en particulier les galactosylglycérides dont l'utilisation
15 est décrite dans la demande de brevet français non encore publiée déposée le 15 février 1995 sous le numéro 95.01714.

A titre d'exemple de produit agissant sur la synthèse du collagène, on citera la vitamine C.

L'invention concerne également un procédé de traitement cosmétique
20 destiné à modifier la surface de la peau en lui conférant un aspect plus lisse par l'atténuation de la profondeur des rides et des ridules, caractérisé en ce que l'on applique sur les zones de la peau à traiter, en particulier sur le visage, une quantité efficace d'un produit ou d'un extrait de plante en contenant, pour obtenir ladite modification de surface, ledit produit ou ledit extrait étant de préférence incorporé
25 dans un excipient cosmétiquement acceptable.

Selon une variante de réalisation de ce procédé de traitement cosmétique, l'extrait de plante précité est un extrait de la plante Commiphora mukul.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la
30 lecture des exemples qui suivent donnés à titre purement illustratif de l'invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : Préparation de l'extrait G selon l'invention

35 On prépare cet extrait par extraction de la résine de Commiphora mukul après broyat des agrégats.

L'extrait est réalisé par l'éthanol à 96 % à 45°C de la façon suivante : on introduit 10 g de résine et 200 ml d'éthanol dans un ballon de 500 ml muni d'un réfrigérant et d'un agitateur et dont le chauffage est assuré par une plaque chauffante.

5 L'agitation et l'extraction durent 2 h minimum, mais il est conseillé de laisser 4 à 5 h pour un meilleur rendement.

Une filtration est faite après extraction suivie d'une évaporation sous vide.

Le rendement d'extraction est d'environ 25 % en poids.

10

Exemple 2 : Préparation de la fraction F II B1 à partir de l'extrait G

Cet exemple est donné en référence au schéma de la figure 1. On donne, dans le tableau 1 ci-dessous, des précisions sur les protocoles B, C, D et E en ce qui concerne la nature et les caractéristiques des colonnes de chromatographie utilisées ainsi que le type de détecteur et la nature des éluants utilisés.

15

TABLEAU 1

20

Commiphora mukul

	Produit à purifier	Colonne	Détecteur	Eluants	Fractions obtenues
Protocole B	extrait G	kromasil 100 C18 150 x 21,7 mm 13 µm	220 nm	méthanol	F, FIII, FIV
Protocole C	fraction F	kromasil 100 C18 150 x 21,7 mm 13 µm	210 nm	gradient méthanol eau	FI, FII
Protocole D	fraction FII	kromasil 100 C18 150 x 21,7 mm 13 µm	210 nm	gradient méthanol eau	FIIA, FIIB, FIIC
Protocole E	extrait G	kromasil 100 C18 150 x 21,7 mm 13 µm	détecteur à diffusion de lumière (DEDL)	gradient méthanol eau	FIIB1

Exemple 3 : Obtention des produits II_a et II_b à partir de la fraction FIIB1

Les deux produits II_a et II_b ont été séparés par chromatographie liquide préparative, et purification sur colonne C18 en élution isocratique par la technique de recyclage. Une détection à 210 nm permet de visualiser les produits II_a et II_b.

5 Les deux produits de formules II_a et II_b ont été totalement identifiés par spectrométrie de masse qui a permis de vérifier les formules brutes établies par RMN.

Les résultats obtenus par RMN du carbone pour les deux produits II_a et II_b sont donnés dans les tableaux 2 et 3 ci-dessous :

10

TABLEAU 2

15 Déplacements chimiques des différents groupements carbonés du produit II_a

Atomes N°	δ ¹³ C ppm	Multiplicité	Atomes N°	δ ¹³ C ppm	Multiplicité
1	38,35	CH ₂	16	26,33	CH ₂
2	34,02	CH ₂	17	124,54	CH
3	217,16	Cquat	18	134,68	Cquat
4	47,57	Cquat	19	39,67	CH ₂
5	55,18	CH	20	26,16	CH ₂
6	21,41	CH ₂	21	126,04	CH
7	43,80	CH ₂	22	134,71	Cquat
8	73,82	Cquat	23	21,41	CH ₃
9	60,36	CH	24	26,33	CH ₃
10	39,39	Cquat	25	14,89	CH ₃
11	25,80	CH ₂	26	23,62	CH ₃
12	31,20	CH ₂	27	16,06	CH ₃
13	124,83	CH	28	16,27	CH ₃
14	135,47	Cquat	29	13,77	CH ₃
15	39,34	CH ₂	30	68,97	CH ₂

20

TABLEAU 3

Déplacements chimiques des différents groupements carbonés du produit II_b

5

Atomes N°	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Multiplicité	Atomes N°	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Multiplicité
1	38,28	CH ₂	16	26,28	CH ₂
2	34,02	CH ₂	17	125,47	CH
3	217,10	Cquat	18	134,55	Cquat
4	47,57	Cquat	19	38,03	CH ₂
5	55,18	CH	20	25,92	CH ₂
6	21,35	CH ₂	21	143,82	CH
7	43,59	CH ₂	22	133,43	Cquat
8	74,54	Cquat	23	21,41	CH ₃
9	60,48	CH	24	26,33	CH ₃
10	39,39	Cquat	25	14,89	CH ₃
11	25,85	CH ₂	26	23,54	CH ₃
12	31,44	CH ₂	27	16,09	CH ₃
13	125,15	CH	28	15,88	CH ₃
14	134,71	Cquat	29	12,27	CH ₃
15	39,38	CH ₂	30	171,14	Cquat

Exemple 4 : Extraction par CO₂ supercritique

L'extraction est réalisée sur environ 240 g de résine brute broyée, en deux étapes de la façon suivante :

10

- Etape 1 :

Cette étape est réalisée dans un appareillage classique, avec du CO₂ pur à 150 bars et 40°C.

La consommation de CO₂ est de 2 000 kg de CO₂ pour 24 kg de résine à extraire.

15

Le rendement d'extraction est d'environ 12,50 % par rapport à la charge de départ. L'extrait obtenu est éliminé.

Etape 2 :

Cette étape est réalisée dans le même appareillage, avec un mélange contenant en poids 98 % de CO₂ à 98 % et 2 % d'éthanol.

On utilise 1 000 kg de CO₂ pour 24 kg de résine brute (soit 18 kg de
5 CO₂ pour 240 g de résine).

Le rendement d'extraction est d'environ 10 % par rapport à la charge de départ. On obtient un extrait dit extrait SFE (supercritical fluid extraction) enrichi en molécules II_a et II_b avec un facteur de concentration de 6 à 8 par rapport à la résine brute.

10

Exemple 5 : Mise en évidence de l'activité des extraits et produits selon l'invention**1. Culture**

Les cellules utilisées sont des 3T3 F442A qui constituent une lignée de
15 pré-adipocytes murins sélectionnés pour leur capacité à se convertir en adipocytes si les conditions de culture le permettent, conformément à la méthode de Green, H & Kehinde, C, Cell 1 (1974) 113.

Cette lignée constitue en effet un modèle d'étude de la différenciation adipocytaire in vitro.

20 Les 3T3 F442A en monocouche lors de la phase de multiplication présentent la morphologie et les caractéristiques enzymatiques de fibroblastes.

Les cellules confluentes dans un premier temps cessent de se diviser pour entrer dans leur phase de différenciation précoce. Cette différenciation conduit à la formation de colonies de cellules qui subissent la conversion
25 adipocytaire.

Cette différenciation s'accompagne de changements dans la biosynthèse de plusieurs protéines et d'une augmentation d'activités enzymatiques différentes (Acetyl CoA carboxylase, ATP citrate lyase, Fatty acid synthétase, phosphoenolpyruvate kinase, glycéro-3-phosphate deshydrogénase dénommé
30 G₃PDH).

On s'est attaché à mesurer l'expression de deux marqueurs de différenciation, la glycéro-3-phosphate deshydrogénase (G₃PDH) d'une part et l'AMP cyclique (AMPc) d'autre part.

35 Il est rappelé à ce propos que l'enzyme G₃PDH permet la formation dans le fibroblaste du glycérol 3-phosphate, molécule impliquée par la suite dans

la synthèse des lipides intracellulaires (triglycérides). Ainsi, l'augmentation de l'activité de la G₃PDH est directement reliée au renforcement de cette synthèse.

Par ailleurs, il est connu que la quantité d'AMPc, médiateur intracellulaire, augmente lors de la réaction de la lipolyse intracellulaire. L'AMPc formée dans la cellule est ensuite excrétée par celle-ci dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la diminution du taux d'AMPc dans le milieu de culture traduit une diminution de la dégradation des triglycérides, donc une accumulation intracellulaire de ces lipides.

La résine de Commiphora Mukul (extrait G), la fraction FIIB1 ainsi que les produits II_a et II_b ont donc été étudiés avec ces deux marqueurs de différenciation.

Les fibroblastes sont ensemencées au fond des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre avec du milieu de culture "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM) en présence de 5 % de sérum de veau (SV) et 5 % de sérum de veau foetal (SVF). Chaque essai est fait en triple.

Pendant la phase de traitement, le milieu est constitué de DMEM + 10 % de sérum de veau foetal.

Le produit ou l'extrait selon l'invention est mis en solution dans de l'éthanol et utilisé sur les cultures à la concentration finale de 5 µg/ml.

Les opérations de culture se déroulent de la manière suivante :

- Au jour J = 0 : ensemencement dans du milieu DMEM + 5 % SV, 5 % SVF
- Au jour J + 2 : changement de milieu
- Au jour J + 5 : traitement par la résine de Commiphora mukul (Extrait G), FIIB1 ou II_a ou II_b à 5 µg/ml dans du milieu DMEM, 10 % SVF
- Au jour J + 6 : dosage AMPc dans du milieu de culture
- Aux jours J + 7 et J + 9 : traitement identique à celui effectué à J + 5
- Au jour J + 12 : broyage des cellules pour dosage G₃PDH.

2. Dosage de l'adénosine 3-5-monophosphate cyclique (AMPc)

Le dosage de l'AMPc réalisé par Radio Immuno Assay dit RIA (Kit Immunotech, société française, référence 1117) est basé sur le principe de la compétition antigène-anticorps. Les échantillons et les standards sont incubés en présence d'AMPc radiomarqué à l'iode 125 dans des tubes ou sont préalablement fixé des anticorps anti AMPc.

Après incubation, le contenu des tubes est aspiré et on compte la radioactivité résiduelle à l'aide d'un compteur gamma. Une courbe standard est préparée avec 6 concentrations connues d'AMPc et on définit la concentration des échantillons grâce à cette courbe étalon.

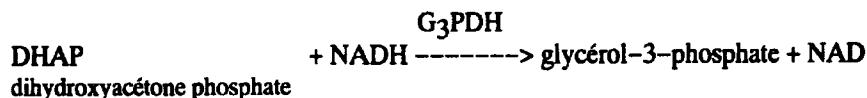
- 5 L'AMPc étant produit et excrété par les cellules, on mesure donc l'AMPc contenu dans le milieu de culture. Plus précisément, on mesure la quantité d'AMPc excrétée dans le milieu de culture en 24 heures.

3. Détermination de l'activité glycéro-3-phosphate déshydrogénase (G₃PDH)

- 10 La monocouche cellulaire est récupérée par grattage et vigoureusement homogénéisée dans du tampon TRIS-HCl (25 mM, pH 7,4) 1 mmole EDTA à 4°C. Le dosage de l'activité G₃PDH est déterminé sur le surnageant du broyat cellulaire aussitôt après centrifugation.

La G₃PDH catalyse la réaction suivante :

15



- 20 On mesure en spectrophotométrie à 340 nm la transformation en fonction du temps du coenzyme NADH (nicotinamide-adénine-dinucléotide hydrogéné) en NAD, ce qui traduit la vitesse de la réaction enzymatique, et donc l'activité de l'enzyme G₃PDH.

- 25 On peut calculer une différence d'absorption (ΔAbs)/min qui correspond à la vitesse initiale de la réaction enzymatique.

Les résultats sont exprimés en activité spécifique soit en nmoles de NADH transformées /min/ mg de protéines cellulaires (le taux de protéines cellulaires total est évalué par la méthode du BCA - PIERCE : protein assay Reagent.).

30

4.1. Activité G₃PDH

Les résultats expérimentaux de l'évaluation de l'activité de l'enzyme G₃PDH figurent au tableau 4 ci-dessous.

- 35 L'activité A₁ des produits selon l'invention sur la stimulation de l'activité de cette enzyme est calculée selon la formule ci-dessous :

$$A_1 = \frac{V_p - V_t}{V_t} \times 100$$

dans laquelle :

V_p est la valeur moyenne entre les trois essais de la vitesse de transformation de la NADH exprimée en nmoles/mn/mg de protéines cellulaires dans les cultures traitées par les produits selon l'invention

5 V_t est la valeur moyenne de cette vitesse dans les cultures témoins.

TABLEAU 4

Cultures	Vitesse de transformation de la NADH nmoles/mn/mg de protéines	Activité A_1 %
Témoins	$49,6 \pm 3,39$	0
Extrait G	156 ± 43	215
Fraction FIIB1	242 ± 42	394
IIa	222 ± 88	348
IIb	352 ± 62	610

10 Il ressort donc très clairement du tableau 4 que les produits selon l'invention, qu'il s'agisse de l'extrait G, de la fraction FIIB1 ou des produits IIa ou IIb, augmentent très fortement l'activité de l'enzyme G₃PDH dans les cultures de fibroblastes, par rapport à l'activité de cette enzyme dans les cultures témoins. On observe en effet que l'activité de cette enzyme est multipliée par 3 par l'action de l'extrait G, et multipliée par 7 par l'action du composé IIb. Ainsi, il est démontré
15 que les produits selon l'invention contribuent à augmenter de manière importante la synthèse de triglycérides intracellulaires.

4.2 Dosage d'AMPc

20 La quantité d'AMPc excrétée en 24 heures dans le milieu des différentes cultures réalisées figure au tableau 5. Elle est exprimée en nmoles/litre de milieu. L'activité A_2 des produits selon l'invention sur l'excrétion de l'AMPc par les cellules, en rapport direct avec la réaction de lipolyse intracellulaire, est calculée selon la formule ci-dessous :

25

$$A_2 = \frac{q_p - q_t}{q_t} \times 100$$

dans laquelle :

q_p représente la quantité moyenne entre les trois essais d'AMPc excrétée dans le milieu des cultures traitées par les produits selon l'invention, exprimée en nmoles/litre/24 heures

5 q_t représente cette quantité moyenne dans le cas des cultures témoins.

TABLEAU 5

Cultures	AMPc excrétée nmoles/litre/24 heures	A ₂ %
Témoins	$66 \pm 3,5$	0
Extrait G	$56,8 \pm 3,8$	- 13,9
FIIB1	42 ± 2	- 36,4

10 Ces résultats figurant au tableau 5 montrent que la quantité d'AMPc excrétée dans le milieu de culture est plus faible dans le cas des cultures traitées par les produits de l'invention que dans le cas des cultures témoins.

Ainsi, dans les cellules de cultures traitées, il apparaît que la lipolyse est très nettement inférieure à celle qui se produit dans les cellules des cultures
15 témoins.

En conclusion, ces essais mettent clairement en évidence que les produits selon l'invention agissent par deux voies complémentaires pour augmenter la quantité de lipides intracellulaires, d'une part en favorisant leur synthèse, ce qui est démontré par l'augmentation de l'activité de l'enzyme G₃PDH, et d'autre part en
20 limitant leur dégradation, ce qui est démontré par la diminution du taux d'AMPc dans les cultures traitées.

On observera en outre que les deux molécules II_a et II_b donnent les résultats les plus élevés apparaissant effectivement comme étant les supports de l'activité lipogénétique des extraits et fractions selon l'invention.

25 Ainsi, les produits selon l'invention accélèrent la différenciation adipocitaire des fibroblastes. De plus, en raison de l'accumulation des lipides, ces cellules augmentent leur volume, permettant ainsi un meilleur contact avec le réseau protéique extra-cellulaire. Le derme se trouve alors consolidé. Cette tonicité du derme entraîne alors une diminution de la profondeur des rides et
30 ridules et confère à la surface de la peau un aspect plus lisse.

Exemple 6 : Crème anti-rides

On prépare une crème anti-rides par mélange des constituants ci-dessous donnés avec leurs pourcentages en poids par rapport à la composition finale en suivant le protocole de préparation suivant :

5 On prépare un mélange A constitué de :

	Brij 72®	0,8
	Brij 721®	2,2
	Tegin 90®	1,7
10	Alcool stéarylique.....	1,8
	Stéarine.....	3,0
	Huile de silicone (Fluid 200®)	0,20
	Squalane.....	10,0
	Miglyol 812®	10,0
15	Acétate de D,L- α -tocophérol	0,2
	Phénonip	0,5
	Extrait supercritique SFE de l'exemple 4	0,5

On ajoute le mélange B constitué de :

20	A :	
	- Glycérine	5,00
	- Eau	58,53
	Carbopol 940	0,20

25 puis C, D et E respectivement constitués de :

	C : Soude 10 %	0,07
	D : Protéines de blé.....	5,00
30	E : Parfum	0,30

Exemple 7 : Gel pour le contour des yeux à activité anti-rides

On prépare une composition par mélange des composants notés A, B, C, D et E ci-dessous dont les constituants sont donnés avec leurs pourcentages en poids par rapport à la composition finale.

5

A :

- Carbopol 1342® 0,40

- Eau 83,20

B : Solution de soude 10 % 0,40

10

C :

- Produit II_a selon l'invention 0,1

- Miglyol 829® 10,00

- Phénonip 0,50

15

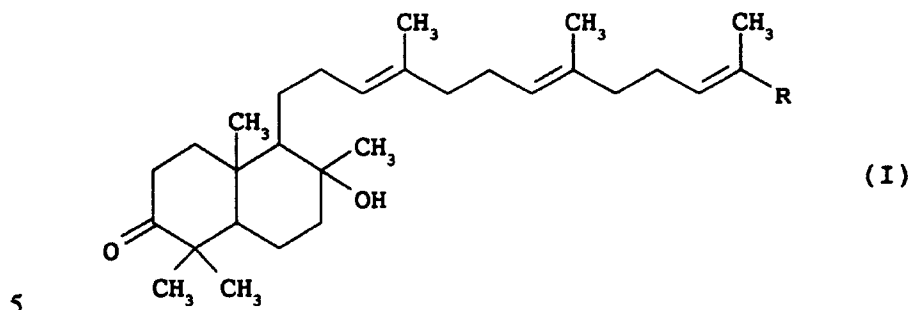
- Acétate de D,L- α -tocophérol 0,20

D : Protéines de blé 5,00

E : Parfum 0,20

REVENDICATIONS

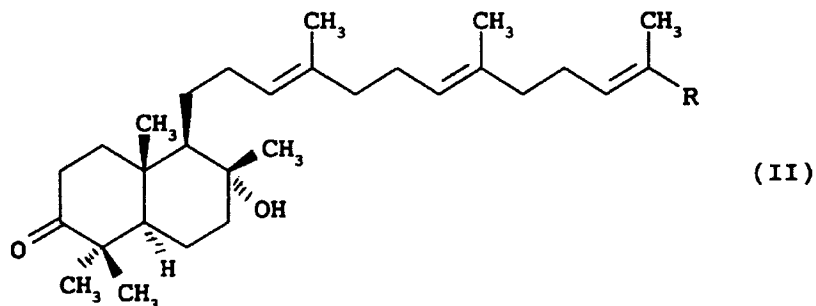
1. Produit répondant à la formule (I) :



dans laquelle R représente :

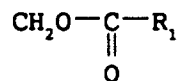
- a) un groupement CH_2OH ,
 b) un groupement COOH ,
 10 ainsi que leurs sels ou esters.

2. Produits répondant à la formule (II) :



15 dans laquelle R représente :

- a) un groupement CH_2OH , le produit étant désigné par la formule II_a ,
 b) un groupement COOH , le produit étant désigné par la formule II_b ,
 c) un groupement

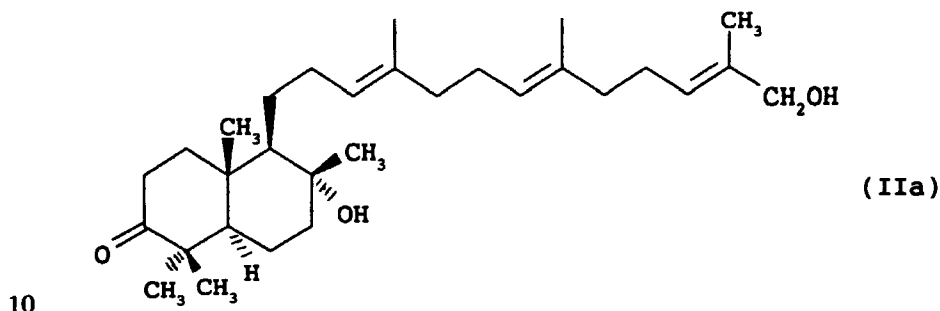


20

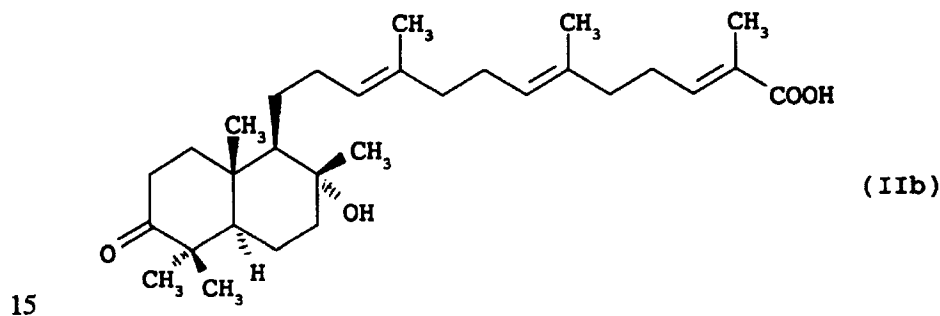
dans lequel R_1 représente un groupe alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, en particulier le groupe méthyle,

- d) un groupement COOM, où M désigne un métal alcalin, de préférence le sodium ou le potassium, ou un groupement ammonium ou amine quaternaire,
 e) un groupement COOM'_{0,5}, où M' désigne un métal alcalino-terreux, de préférence le calcium,
 5 f) un groupement COOR₂, où R₂ désigne un groupement alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 6 atomes de carbone.

3. Produit selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (II_a)



4. Produit selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (II_b)



5. Procédé de préparation d'un produit tel que défini dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste à traiter, par extraction par un solvant organique, de la résine de Commiphora mukul pour la préparation d'un
 20 extrait dit extrait G et à soumettre ledit extrait G à au moins une étape de fractionnement pour isoler une fraction constituée majoritairement d'un produit répondant à la formule II_a et/ou d'un produit répondant à la formule II_b et à réaliser, le cas échéant, une acylation du produit II_a ou une salification ou une estérification du produit II_b.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le solvant utilisé pour réaliser l'extraction possède un paramètre de solubilité p' inférieur à 5,5, de préférence compris entre 0,1 et 4,5.

5 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le solvant utilisé pour réaliser l'extraction est choisi parmi le groupe constitué par : le n-pentane, le n-hexane, l'éther de pétrole, le cyclohexane, le n-décane, le dichlorométhane, l'isopropanol, le n-propanol, le chloroforme, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le méthanol.

10 8. Utilisation d'au moins un extrait de plante du genre Commiphora, en particulier de la plante Commiphora mukul, comme agent cosmétique destiné à modifier la surface de la peau en lui conférant un aspect plus lisse par l'atténuation de la profondeur des rides et des ridules.

15 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit extrait est un extrait de la résine de la plante Commiphora mukul, encore appelée Guggul.

10. Utilisation selon les revendications 8 ou 9, caractérisée en ce que ledit extrait est obtenu après broyat des agrégats de la résine, par extraction par un solvant de polarité p' inférieur à 5,5, de préférence compris entre 0,1 et 4,5.

20 11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisé en ce que le solvant utilisé pour réaliser l'extraction est choisi parmi le groupe constitué par : le n-pentane, le n-hexane, l'éther de pétrole, le cyclohexane, le n-décane, le dichlorométhane, l'isopropanol, le n-propanol, le chloroforme, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le méthanol.

25 12. Utilisation selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisée en ce que ledit extrait est obtenu par extraction de la plante Commiphora mukul par le gaz carbonique à l'état supercritique.

30 13. Utilisation selon l'une des revendications 8 ou 12, caractérisée en ce que ledit extrait est enrichi en produit selon l'une des revendications 1 à 4 par fractionnement, notamment par fractionnement par chromatographie liquide haute performance à partir de l'extrait décrit dans la revendication 10 ou 11.

14. Utilisation d'au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 4 comme agent cosmétique destiné à modifier la surface de la peau en lui conférant un aspect plus lisse par l'atténuation de la profondeur des rides et des ridules.

35 15. Composition, en particulier destinée à un usage cosmétique, caractérisée en ce qu'elle contient l'un au moins des produits tels que définis à l'une

quelconque des revendications 1 à 4, ou un extrait de plante contenant l'un de ces produits, en particulier un extrait de plante du genre *Commiphora*, encore en particulier de la plante *Commiphora mukul*, de préférence en combinaison avec un excipient ou support acceptable, en particulier cosmétiquement acceptable.

5 16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,001 à 1 % en poids de l'un au moins des produits précités, de préférence de 0,01 à 0,1 %.

10 17. Composition selon l'une des revendications 15 ou 16, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,005 à 5 % en poids, de préférence de 0,05 à 1 % en poids d'un extrait de *Commiphora mukul* contenant au moins l'un des produits précités.

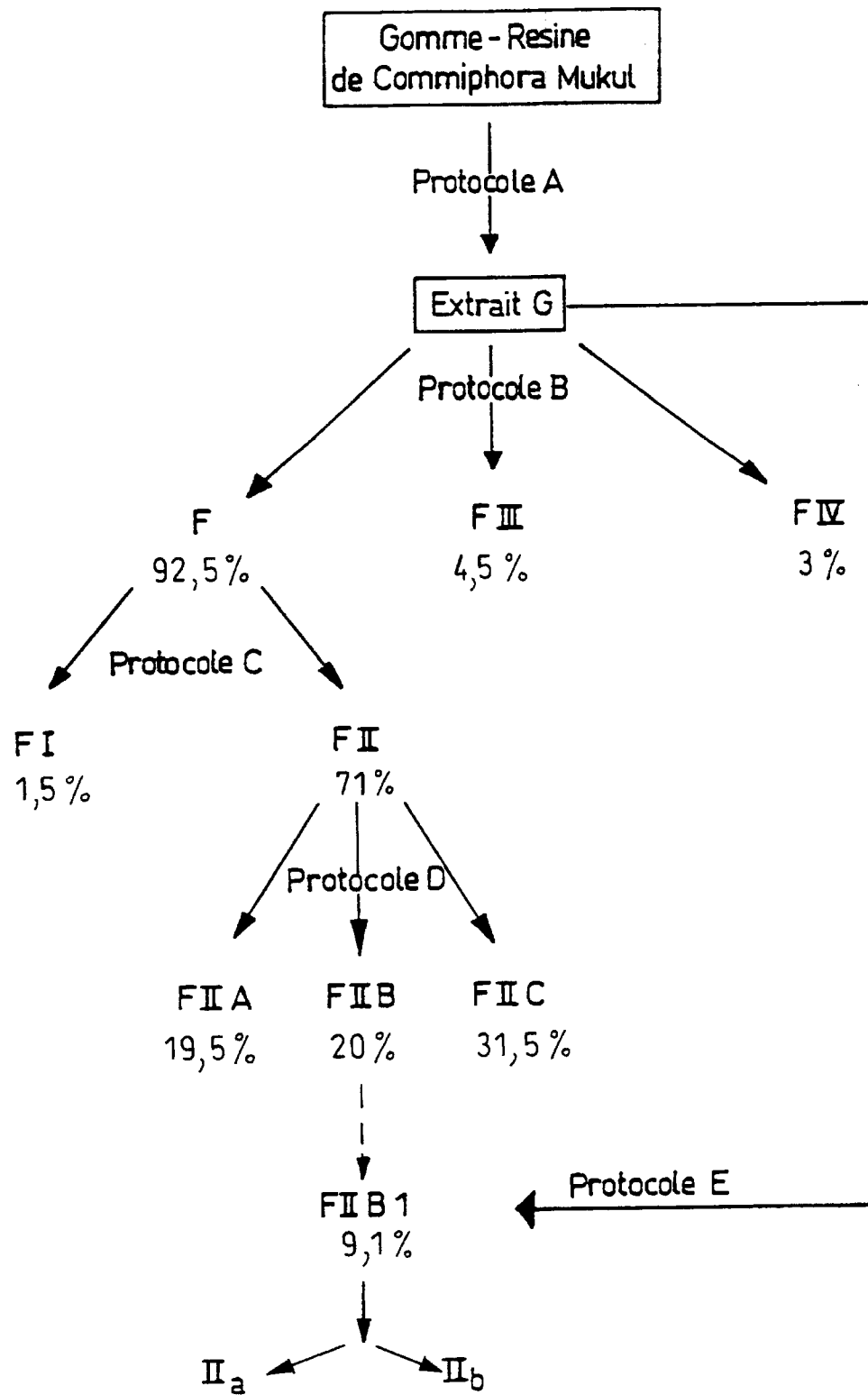
 18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'extrait de *Commiphora mukul* est un extrait de résine de cette plante.

15 19. Composition selon l'une des revendications 15 à 18, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un produit agissant sur la synthèse de la fibronectine, tel qu'un galactolipide, en particulier un galactosylglycéride.

 20. Composition selon l'une des revendications 15 à 19, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un produit agissant sur la synthèse du collagène, tel que la vitamine C.

20 21. Procédé de traitement cosmétique destiné à modifier la surface de la peau en lui conférant un aspect plus lisse par l'atténuation de la profondeur des rides et des ridules, caractérisé en ce que l'on applique sur les zones de la peau à traiter, en particulier sur le visage, une quantité efficace d'un produit selon l'une des revendications 1 à 4 ou d'un extrait de plante en contenant, pour obtenir ladite
25 modification de surface, ledit produit ou ledit extrait étant de préférence incorporé dans un excipient cosmétiquement acceptable.

 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'extrait de plante précité est un extrait de la plante *Commiphora mukul* défini à l'une quelconque des revendications 8 à 13.



REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2738565

N° d'enregistrement
national

FA 519432
FR 9510710

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	EP-A-0 513 671 (INDENA SPA) 19 Novembre 1992 * le document en entier * -----	5,8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07C A61K
Date d'achèvement de la recherche 21 Mai 1996		Examineur Bonnevalle, E
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 01.92 (P04 C13)